บทที่ 2

อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.เครื่องเขย่า(shaker)รุ่น G-10 แบบ rotary ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.,USA.

2.เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ แบบ rotary ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.,USA.

3.เครื่องปั่นเหวี่ยง(centrifuge)รุ่น KS-3000P ของบริษัท Kubota, Japan

4.เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ(refrigerated centrifuge) รุ่น J2 - 21 ของบริษัท Beckman,USA.

5.เครื่องชั่งหยาบ(laboratory balance)รุ่น L2200P ของบริษัท Sartorius, Germany.

6.เครื่องชั่งละเอียด(analytical balance)รุ่น S2000B ของบริษัท Beckman, USA.

7.เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง(UV-VIS spectrophotometer) รุ่น 200 - 20 ของบริษัท Shimadzu,Japan.

8.เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง(pH meter)รุ่น 240 ของบริษัท Corning,USA.

9.ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124 ของบริษัท ISSCO,USA.

10.ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Hearson,England.

11.ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ(incubator) ของบริษัท Memmert,Germany.

12.หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA - 36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo,Japan.

13.เครื่องหมัก(fermenter) รุ่น MD 300 และชุดควบคุมสภาวะของบริษัท L.E. Marubishi Co.,Ltd,Japan.

14.เครื่องกาซโครมาโตกราฟี (gas chromatography) รุ่น HP 5890 Series II ของบริษัท Hewlett Packard USA.

15.แคปพิลลารีคอลัมน์ (capillary column) ชนิด FFAP เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มล. ความยาว 10 มล. ของบริษัท Hewlett Packard USA.

16.เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography : HPLC) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu,Japan.

17.เครื่องอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Infrared spectrophotometer) รุ่น 1720 FTIR ของบริษัท Perkin-Elmer

18.เครื่องหาอุณหภูมิหลอมเหลว(T_m)และหา glass transition temperature (T_g) (differential scanning colorimeter, DSC)

19.เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer) รุ่น SP 80 SY ของบริษัท Bruker

20.เครื่องวิเคราะห์ธาตุ (elemental analyzer) รุ่น 240 ของบริษัท Perkin -Elmer

21.เครื่องหาน้ำหนักโมเลกุล (gel permeation chromatography : GPC)รุ่น Water 150-CV ของบริษัท Waters

<u>เคมีภัณฑ์</u>

1.พอลี-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต ของบริษัท Sigma chemical company, USA.

2.พอลี (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรท-24%3-ไฮดรอกซีวาเลอเรท) ของบริษัท Aldrich Chemical Company Inc.

3.โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทีเรท ($C_4H_7O_3Na$) ของบริษัท Sigma chemical company,USA.

4.แผ่นโครมาโตกราฟีแบบผิวบางที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล siliga gel G60 F 254 ของ E.Merck Damstadt, Germany.

5.คลอโรฟอร์ม ของบริษัท E.Merck Damstadt, Germany.

6.อะซีโตน ของบริษัท E.Merck Damstadt, Germany.

7.เอทธานอล ของบริษัท E.Merck Damstadt, Germany

8.กรดซัลฟุริก ของบริษัท E.Merck Damstadt, Germany

9.ไดเอทธิลอีเธอร์ ของบริษัท E.Merck Damstadt, Germany

10.ฟรุกโตส ของบริษัท E.Merck Damstdt, Germany

11.กลูโคส ของบริษัท E.Merck Damstdt, Germany

12.ซูโครส ของบริษัท E.Merck Damstdt, Germany

13.แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของบริษัท May & Baker laboratory chemical,England

14.ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต($Na_2HPO_4.2H_2O$)ของบริษัท Riedel de Heanag Speelze, England

15.แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท E.Merck Damstadt,Germany

16.โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Carolerba,Italy.

17.แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต ($(NH_4)_6MoO_{24}.4H_2O$) ของบริษัท J.T. Baker,USA.

18.คลอรอกซ์ (clorox) ของบริษัท The Clorox company, USA.

19.กรดเบนโซอิก(C_6H_5COOH) ของบริษัท Nacalai tesque Inc.Japan.

20.เมทธานอล ของบริษัท E.Merck Damstadt,Germany.

เคมีภัณฑ์ชนิดอื่นๆ เป็นเคมีภัณฑ์ ระดับวิเคราะห์ (analytical reagent grade) จากบริษัทต่างๆซึ่งนำมาใช้โดยไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์อีก

สารอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ (media) เช่น ผงยีสต์สกัด สารสกัดจากเนื้อ และเพปโตนของบริษัท Difco USA.และพอลิเพปโตน เป็นของบริษัท Becton Dickinson,USA.

กากน้ำตาล (molasses) ได้รับการอนุเคราะห์จาก บริษัทสุราทิพย์ จำกัด

จุลินทรีย์

ใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้ใหม่ รวมจำนวน 30 สายพันธุ์ มาศึกษาหาความสามารถในการสร้าง และสะสม พอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทีเรท (PHB)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.สูตรอาหารเหลวสำหรับการแยกเชื้อจุลินทรีย์

Peptone medium (Forsyth และคณะ, 1958) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

เพปโตน	5	กรัม
กลูโคส	20	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °ซ และ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (การนึ่งฆ่าเชื้อ แบบมาตรฐาน)

2.สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
เพปโตน	5	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

3. สูตรอาหารเหลวสำหรับการเตรียมกล้าเชื้อ (starter)

สูตรที่ 1 (nutrient broth ของ Difco) ใน 1 ลิตรประกอบด้วย

สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
เพปโตน	5	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

สูตรที่ 2 (Rich medium) (Doi และคณะ, 1986) ใน 1 ลิตรประกอบด้วย

ผงสกัดจากยีสต์	10	กรัม
พอลีเพปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
ฟรุกโตส	10	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน (แยกสารละลายฟรุกโตส นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที)

สูตรที่ 3 (Doi และคณะ, 1988) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

ผงสกัดจากยีสต์	10	กรัม
พอลิเพปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	5	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	5	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

4. สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อการสร้างและสะสม PHB

MSM (Mineral Salt Medium) (Ramsay และคณะ,1989) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	1.0	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	0.6	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	20.0	มก.
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	1.3	มก.
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.2	มก.
โมลิบดิกแอซิด ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$)	0.6	มก.

บอริกแอซิด (H_3BO_3)	0.6	มก.
สารสกัดจากยีสต์	0.1	กรัม
ฟรุกโตส	20.0	กรัม

(หรือ ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่น และ ปริมาณ ตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง)

ปรับพีเอชเป็น 7.0 โดยใช้ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3 โมลาร์ แยกส่วนของสารละลายเกลือ และสารสกัดจากยีสต์ ไปนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน ส่วนของสารละลายฟรุกโตสนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 °ซ เป็นเวลา 10 นาที

การแยก การเก็บรักษา และการคัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สามารถสร้างและสะสม PHB

1. การแยกจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สามารถสร้างและสะสม PHB

แยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างที่รวบรวมจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารในข้อ 1 ทำการแยกเชื้อซ้ำ จนได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วจึงศึกษาหาสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างและสะสม PHB ด้วยการย้อมสี Sudan Black B ตามวิธีของ Smibert และ Krieg (1981) (ภาคผนวกที่ 1)

2. การเก็บรักษาจุลินทรีย์

นำเชื้อจุลินทรีย์มาปลูกลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำมาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารใหม่ (subculture) ทุก ๆ 1 เดือน และอีกวิธีหนึ่ง คือเติมพาราฟินเหลว(liquid paraffin) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เททับบนผิวหน้าอาหารแข็งเอียงที่มีเชื้อเจริญอยู่ นำไปเก็บในตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส (เพื่อเป็น master stock)

3.การเตรียมหัวเชื้อสำหรับกล้าเชื้อ (starter)

ปลูกเชื้อจุลินทรีย์จากเชื้อที่เก็บรักษาไว้ตามข้อ 2 บนอาหารแข็งเอียง โดยนำมาทำให้เซลล์แขวนลอย (resuspend) ในสารละลายเกลือแกงเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (physiological saline) วัดการดูดกลืนแสงของเชื้อที่กระจาย (cell suspensions)ในสารละลาย ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (A_{600}) ปรับให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อตามข้อ 3 สูตรที่ 2 หน้า 27 ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.การคัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สามารถสร้างและสะสม PHB ได้สูง

นำหัวเชื้อจากข้อ 3 ปริมาณ 1 มล. ปลูกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ข้อ 4 หน้า 27 ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. โดยแปรแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด คือ กลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 72 ชม. เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณ PHB และน้ำหนักเซลล์แห้ง เปรียบเทียบการสร้างและสะสม PHB ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ และแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณ PHB สูงสุด

การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019

1.การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological Characteristics)

1.1 การย้อมติดสีแกรม รูปร่างลักษณะของเซลล์ และ การเรียงตัวของเซลล์

ตรวจสอบการย้อมติดสีแกรม รูปร่างลักษณะ และ การเรียงตัวของเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 โดยการย้อมแกรม ตามวิธีใน Bergey's Mannual

Of Systematic Bacteriology (Peter,1986) นำเชื้อที่ได้จากการเก็บรักษาตามข้อ 2 หน้า 28 บนอาหารแข็งเอียง มาทำการเกลี่ยให้เชื้อกระจาย (smear) และ ทำให้ติด (fix) บนสไลด์ หยดสีคริสตัล ไวโอเล็ต (crystal violet) ให้ท่วมสไลด์ เป็นเวลา 1 นาที ไล่สีที่เกินออกด้วยสารละลายไอโอดีน และ หยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมสไลด์ เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีไอโอดีนออก ด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ และ ย้อมทับ (counterstain) ด้วยสีซาฟรานินโอ (safranin O) เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีออก นำไปตรวจลักษณะรูปร่าง และ การติดสีของเชื้อแบคทีเรีย ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดย เชื้อที่ติดสีม่วงของ คริสตัลไวโอเล็ต จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive) ส่วนเชื้อที่ติดสีแดงของซาฟรานินโอ จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative)

1.2 การตรวจพบเอนโดสปอร์

ตรวจสอบการสร้างเอนโดสปอร์ของแบคทีเรีย BA-019 โดยการย้อมสปอร์ ตามวิธีของ Ashby (1938) นำสไลด์ของเชื้อ BA-019 ที่ผ่านการเกลี่ยเชื้อให้กระจาย และทำให้ติดบนสไลด์ โดยใช้เชื้อที่ได้จากการเก็บรักษา ตามข้อ 2 หน้า 28 บนอาหารแข็งเอียง มาหยดสีมาลาไคท์ กรีน (malachite green) ให้ท่วมบริเวณที่มีเชื้อ โดยให้ความร้อนแก่สไลด์ ด้วยการอังไอน้ำเดือด ให้สีสัมผัสกับสไลด์ เป็นเวลา 10 นาที เมื่อสไลด์เย็น ล้างน้ำ และย้อมทับด้วยสีซาฟรานินโอ เป็นเวลา 1 นาที นำไปตรวจลักษณะการสร้างสปอร์ของเชื้อ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยเอนโดสปอร์จะติดสีเขียวของมาลาไคท์ กรีน ส่วนเซลล์ (vegetative cell) จะติดสีแดงของซาฟรานินโอ

2.การศึกษาลักษณะทางชีวเคมี (Biochemical Characteristic)

เนื่องจากพบว่า เชื้อ BA-019 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น และมีการสร้างเอนโดสปอร์ ซึ่งศึกษาลักษณะดังกล่าวตามหลักของ Bergey's Mannual Of Systematic Bacteriology (Peter, 1984) เป็นไปได้ว่า อาจจะจัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม หรือท่อน ที่สามารถสร้างสปอร์ได้ (endospore-forming

rods and cocci) ดังนั้นในการศึกษาทางชีวเคมี จะศึกษาโดยใช้ลักษณะที่ชัดเจนของการทดสอบจำแนกแยกจุลินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มนี้ คือ การทดสอบคะตาเลส (catalase test) โดยนำแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ที่ได้จากการเก็บรักษาตามข้อ 2 หน้า 28 บนอาหารแข็งเอียงปลูกบนอาหาร TGE agar (ภาคผนวกที่ 2) บ่มเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส โดยการหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 เปอร์เซนต์ ปริมาณ 2-3 หยด ลงบนโคโลนีของเชื้อ การเกิดฟองก๊าซ (Bubbles) แสดงถึงผลบวกของการสร้างเอนไซม์คะตาเลสของเชื้อ

<u>วิธีการสกัดแยกและทำให้สารผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์</u>

ใช้วิธีที่ปรับปรุงแล้ว โดย อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) ซึ่งปรับปรุงจากวิธีของ Brivonese และ Sutherland (1989) โดยเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือกในสูตรอาหาร MSM ปริมาตร 3 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ควบคุมปริมาณอากาศ ด้วยอัตราการกวน เท่ากับ 500 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm (ปริมาตรอากาศ ต่อ ปริมาตรอาหาร ต่อ นาที) และควบคุมพีเอชเป็น 6 แล้วแยกส่วนเซลล์ออกโดยการปั่นที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำเซลล์มาบ่มในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ หรือคลอรอกซ์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นที่ความเร็วรอบเท่าเดิม เพื่อเก็บตะกอนล้างด้วยอะซีโตน และเอทธานอล ตามลำดับ สกัดแยก PHB จากตะกอนที่ได้ด้วยคลอโรฟอร์มร้อน โดยวางในน้ำเดือด เป็นเวลา 30 วินาที กรองส่วนใสที่ได้ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำไประเหยออกที่อุณหภูมิ 80 °ซ จากนั้นตกตะกอนด้วยไดเอทธิลอีเทอร์ แล้วแยกตะกอนออก ด้วยการปั่น ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนตะกอน PHB มาละลายด้วยคลอโรฟอร์มอีกครั้ง ตกตะกอนซ้ำ 2 ครั้งด้วยไดเอทธิลอีเธอร์ นำส่วนของตะกอนมาอบให้แห้งในตู้อบซึ่งมีอุณหภูมิ 80 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Juttner และคณะ,1975) แล้วเก็บไว้ใน desiccator เพื่อทำการศึกษาลักษณะต่อไป

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของสารผลิตภัณฑ์

1. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง

นำสารผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ดังวิธีในหน้า 31 และ PHB มาตรฐาน มาละลายด้วยคลอโรฟอร์มให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ คือ 0.25 0.5 1.0 มก./มล. หยด (spot) สารผลิตภัณฑ์ และ PHB มาตรฐาน ปริมาณอย่างละ 5 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (TLC) ที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล เป่าให้แห้ง นำไปวางในอ่าง TLC (TLC chamber) ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย (solvent system) 5 ระบบ ได้แก่

1. อะซีโตน : คลอโรฟอร์ม : เมทธานอล : กรดอะซิติก : น้ำ ในอัตราส่วน 10 : 4 : 2 : 2 : 1

2. คลอโรฟอร์ม : เมทธานอล : กรดอะซิติก : น้ำ ในอัตราส่วน 15 : 5 : 2 : 1

3. ปิโตรเลียมอีเธอร์ : เมทธิลเอทธิลคีโตน : กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 95: 4 : 1

4. คลอโรฟอร์ม : เมทธานอล : กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 10 : 4 : 2 : 1

5. เบนซีน : เฮกเซน : เมทธานอล : กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 10 : 4 : 2 : 1

จากนั้นปล่อยให้แผ่นโครมาโตกราฟีแห้ง แล้วนำมาอบด้วยไอของไอโอดีนจนปรากฏรอยสาร บันทึกตำแหน่ง เลือกความเข้มข้นที่ใช้หยด และ ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด เพื่อนำมาคำนวณค่า R_f (retention factor) ของสารผลิตภัณฑ์ และ PHB มาตรฐาน แล้วเปรียบเทียบค่า R_f ระหว่างสองสาร

$$\text{ค่า } R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

2.การตรวจลักษณะสารที่สกัดได้ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี

โดยวิธีของ Comeau และคณะ (1988) นำแผ่นฟิล์มบริสุทธิ์ที่ได้จากวิธีในหน้า 31 ปริมาณ 20 มิลลิกรัม ที่ละลายอยู่ในคลอโรฟอร์ม ปริมาณ 1 มล. ซึ่งอยู่ในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 50 มล. ใส่ในหลอดฝาเกลียว เติมคลอโรฟอร์มปริมาณ 1 มล. เติมเมทธานอลที่มีกรดซัลฟุริกเข้มข้น 3 เปอร์เซนต์โดยปริมาตร 2 มล. ซึ่งมีกรดเบนโซอิกเป็นสารละลายมาตรฐานภายใน ปริมาณ 500 ไมโครกรัม นำไปอุ่นที่ 80 °ซ เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นปริมาณ 1 มล. เขย่าให้เข้ากัน และปั่นที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ดูดชั้นน้ำที่มีกากเซลล์และกรดปนอยู่ทิ้ง เก็บชั้นคลอโรฟอร์ม(ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์เมทธิลเอสเทอร์ของหน่วยย่อย นำไปวิเคราะห์หาชนิด และปริมาณของหน่วยย่อย โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี สำหรับสารมาตรฐานได้แก่ PHB P(3HB-co-24% 3HV) และ P(4HB) เตรียมโดยวิธีเดียวกัน โดยใช้ภาวะดังนี้

คอลัมน์ : แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด FFAP เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ยาว 25 เมตร

split ratio 50:1

อุณหภูมิของ Flame ionization detector : 250 °ซ

อุณหภูมิในการ Injection : 250 °ซ

อุณหภูมิของคอลัมน์ : 150 °ซ

ชนิดของก๊าซตัวพา : ฮีเลียม

การวิเคราะห์ชนิดของหน่วยย่อย โดยการเปรียบเทียบ เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) กับ เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารมาตรฐาน P(3HB) P(3HB-co-24%-3HV) และ P(4HB)

3.การตรวจโครงสร้างโมเลกุลโดยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

นำแผ่นฟิล์มบริสุทธิ์ที่ได้จากวิธีในหน้า 31 มาละลายด้วยคลอโรฟอร์ม แล้ว

หยดลงบนแผ่นซิลเวอร์คลอไรด์ เกลี่ยให้ทั่วแผ่นทิ้งให้แห้ง วัดค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ช่วงคลื่น 400 ถึง 4000 cm^{-1}

4.การตรวจโครงสร้างโมเลกุลโดยเครื่อง NMR

นำแผ่นฟิล์มบริสุทธิ์ที่ได้จากวิธีในหน้า 31 วัด ^{1}H-NMR ที่ความถี่ 500 MHz และ ^{13}C-NMR ที่ความถี่ 125 MHz โดยใช้ $CDCl_3$ (deuterated chloroform) เป็นตัวทำละลาย และ TMS (tetramethylsilane) เป็นสารมาตรฐานภายใน

5.การตรวจสอบปริมาณธาตุไฮโดรเจนและคาร์บอน

นำสารผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ที่ได้ จากวิธีในหน้า 31 และ PHB มาตรฐาน มาตรวจหาเปอร์เซนต์ธาตุไฮโดรเจนและคาร์บอน โดยเครื่องวิเคราะห์ธาตุ โดยใช้สภาวะดังนี้คือ :-

อุณหภูมิในการ Combustion ที่ 950 $^{\circ}$ ซ

อุณหภูมิในการ Reduction ที่ 650 $^{\circ}$ ซ

ความดันของฮีเลียม ที่ 18.5 psi

ความดันของออกซิเจน ที่ 17.5 psi

6.การวิเคราะห์หาค่าของอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) และ glass transition temperature (T_g)

นำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากวิธีในหน้า 31 และ PHB มาตรฐาน วิเคราะห์หาค่า T_m และ T_g โดยวิธี Differential scanning calorimetry (DSC) โดย calibrate ที่ scan rate เท่ากับ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ภายใต้ภาวะของกาซฮีเลียม และใช้อินเดียม (indium) กับ ไซโคลเฮกเซน (cyclohexane) เป็นสารมาตรฐาน ในการ calibrate วิเคราะห์หาค่า T_m และ T_g โดยเริ่มจาก อุณหภูมิ -80 $^{\circ}$ซ และเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 10 $^{\circ}$ ซ/นาที ถึง 200 $^{\circ}$ ซ

7.การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล

นำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากวิธีในหน้า 31 และ PHB มาตรฐาน หนัก 0.0200 กรัม มาวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง GPC โดยนำมาละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาณ 5 มล.ในขวดวัดปริมาตร กรองตัวอย่างผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน และฉีดตัวอย่างเข้าเครื่องปริมาณ 0.1 มล.โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็น mobile phase และ ควบคุมการทำงานของเครื่อง GPC ที่อุณหภูมิ 40 °ซ โดยใช้ชนิดของคอลัมน์เป็น สไตราเจลเอสที ลิเนียร์ (Styragel ST linear column) จำนวน 2 คอลัมน์ และ อุลตราสไตราเจล เอสที (Ultrastyragel ST column) จำนวน 1 คอลัมน์ (Mergaert และคณะ, 1993)

การหาระยะเวลาในการเลี้ยงกล้าเชื้อเพื่อให้ได้เชื้อเริ่มต้นปริมาณมาก

ได้ทำการวิจัย คัดเลือกสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ จำนวน 3 สูตร ตามที่แสดงในข้อ 3 หน้า 26 และ 27 และพบว่า เมื่อเลี้ยงใน อาหารสูตรที่ 2 แบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 จะให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (ผลไม่ได้นำเสนอไว้) ดังนั้น นำหัวเชื้อจากข้อ 3 หน้า 28 ปริมาณ 1 มล. ถ่ายลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ สูตรที่ 2 ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 30 ชม. โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชม. มาทำการวิเคราะห์ หาความหนาแน่นของเซลล์ โดยการหาค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ปริมาณ PHB และ น้ำหนักเซลล์แห้ง

การหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณการสร้าง และสะสม PHB ในอาหาร MSM

1.การคัดเลือกชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน

นำกล้าเชื้อที่ได้จากการศึกษาหน้า 35 ปริมาณ 1 มล. ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

I20585147

MSM ปริมาณ 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มล. แปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนดังนี้ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง อย่างละ 10 และ 20 กรัมต่อลิตร และแหล่งคาร์บอนราคาถูกได้แก่ กากน้ำตาล ในปริมาณ 2 และ 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณ PHB และน้ำหนักเซลล์แห้งทุกๆ 24 ชั่วโมงจนครบ 72 ชั่วโมง

2.การหาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสม

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ คือ แอมโมเนียมซัลเฟต ถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากการศึกษา หน้า 35 ปริมาณ 1 มล.ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาณ 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มล. ที่ใช้ชนิด และปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่ได้จากการศึกษาตามข้อ 1 โดยแปรผันความเข้มข้น เท่ากับ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสารอาหารชนิดอื่นๆ ในสูตรอาหาร MSM ที่แสดงในข้อ 4 หน้า 27 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณ PHB และน้ำหนักเซลล์แห้งทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.การหาเวลาที่เหมาะสมในการสร้าง และสะสม PHB

ถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากการศึกษา หน้า 35 ปริมาณ 1 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาณ 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มล. ที่ใช้ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนตามข้อ 1 ใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตตามข้อ 2 สารอาหารชนิดอื่นๆ ตามสูตร MSM ที่แสดงในข้อ 4 หน้า 27 โดยค่าพีเอชเริ่มต้น และอุณหภูมิ เท่ากับ 6.2 และ 30 °ซ ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณ PHB และน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณโปรตีน ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ทุก ๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.การหาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม

ถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากการศึกษา หน้า 35 ปริมาณ 1 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาณ 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มล. ที่ใช้ชนิด และ ปริมาณของแหล่งคาร์บอนตามข้อ 1 และใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตตามข้อ 2 และ สารอาหารชนิดอื่นๆ ตามสูตร MSM ที่แสดงไว้ในข้อ 4 หน้า 27 โดยแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณ PHB และ น้ำหนักเซลล์แห้ง โดยเริ่มต้นเก็บ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24

5.การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากการศึกษา หน้า 35 ปริมาณ 1 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาณ 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มล. ที่ใช้ชนิด และปริมาณของแหล่งคาร์บอน ตามข้อ 1 ใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตตามข้อ 2 สารอาหารชนิดอื่นๆ ตามสูตร MSM ที่แสดงในข้อ 4 หน้า 27 และ ใช้พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 4 แปรผันอุณหภูมิเท่ากับ 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณ PHB และน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยเริ่มต้นเก็บตัวอย่าง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24

6.การหาปริมาณฟอสเฟตที่เหมาะสม

แหล่งฟอตเฟตที่ใช้ คือ โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอตเฟต (Na_2HPO_4) ถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากการศึกษา หน้า 35 ปริมาณ 1 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาณ 50 มล.ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มล. ที่ใช้ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนตามข้อ 1 ใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตตามข้อ 2 สารอาหารชนิดอื่นๆ ตามสูตร MSM ที่แสดงในข้อ 4 หน้า 27 โดยค่าพีเอชเริ่มต้น และอุณหภูมิ

ที่เหมาะสมใช้ตามข้อ 4 และ 5 ตามลำดับ แปรผันอัตราส่วนระหว่าง KH_2PO_4:Na_2HPO_4 ดังนี้คือ 1:0.3 2:0.6 และ 3:0.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณ PHB และน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยเริ่มต้นเก็บตัวอย่าง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24

7.การหาชนิด และปริมาณสัดส่วนของฟอตเฟตและโพแทสเซียมที่เหมาะสม

จากข้อ 6 ปริมาณอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง KH_2PO_4: Na_2HPO_4 เท่ากับ 2:0.6 จากอัตราส่วนนี้จะทำการแปรผันสัดส่วนของฟอตเฟต 2 ชนิด คือ แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอตเฟต ($NH_4H_2PO_4$) และ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอตเฟต (Na_2HPO_4) และโพแทสเซียมซึ่งอยู่ในรูปโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากการศึกษา หน้า 35 ปริมาณ 1 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาณ 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มล. ที่ใช้ชนิด และปริมาณของแหล่งคาร์บอนตามข้อ 1 ใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตตามข้อ 2 สารอาหารชนิดอื่นๆ ตามสูตร MSM ที่แสดงในข้อ 4 หน้า 27 โดยค่าพีเอชเริ่มต้น และอุณหภูมิที่เหมาะสมใช้ตามข้อ 4 และ 5 ตามลำดับ ทำการแปรผันสัดส่วนของ KH_2PO_4: Na_2HPO_4 โดยคิดเป็นปริมาณฟอตเฟตรวม (กรัมต่อลิตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM (เสนอค่าในวงเล็บ) โดยสัดส่วนของ KH_2PO_4: Na_2HPO_4 เป็น 1.35:0(0.90) 2.10:0(1.40) 2.70:0(1.80) 0.60:2(1.80) 3.45:0(2.30) 4.05:0(2.70) กรัมต่อลิตร(กรัมต่อลิตร) และแปรผันสัดส่วนของ $NH_4H_2PO_4$: KH_2PO_4 เป็น 1.09:0 (0.90) 1.69:0(1.40) 2.17:0(1.80) 1.69:2(1.80) 2.78:0(2.30) และ 3.26:0(2.70) กรัมต่อลิตร(กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณ PHB และน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยเริ่มต้นเก็บตัวอย่าง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24

8. การหาปริมาณแมกนีเซียมที่เหมาะสม

แหล่งแมกนีเซียมที่ใช้ คือ $MgSO_4$ ถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากการศึกษาหน้า 35 ปริมาณ 1 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาณ 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มล. ที่ใช้ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนตามข้อ 1 ใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตตามข้อ 2 และใช้สัดส่วนฟอตเฟตและโพแทสเซียมตามข้อ 7 ส่วนสารอาหารชนิดอื่น ๆ ตามสูตร MSMที่แสดงในข้อ 4 หน้า 27 ค่าพีเอชเริ่มต้น และอุณหภูมิที่เหมาะสมใช้ ตามข้อ 4 และ 5 ตามลำดับ ทำการแปรผันปริมาณ $MgSO_4$ เท่ากับ 0 0.1 0.2 และ 0.3 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณ PHB และน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยเก็บตัวอย่าง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24

9. การหาชนิดและปริมาณอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสม

ถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากการศึกษา หน้า 35 ปริมาณ 1 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่ใช้ชนิด และ ปริมาณของแหล่งคาร์บอนตามข้อ 1 ใช้สัดส่วนฟอตเฟตและโพแทสเซียมตามข้อ 7 ใช้ปริมาณแมกนีเซียมตามข้อ 8 ส่วนสารอาหารชนิดอื่นๆ ตามสูตร MSM ที่แสดงในข้อ 4 โดยยกเว้นไม่มีแอมโมเนียมซัลเฟต พีเอชเริ่มต้น และ อุณหภูมิที่เหมาะสมใช้ตามข้อ 4 และ 5 ตามลำดับ แปรผันชนิด และปริมาณของอินทรีย์ไนโตรเจน 6 ชนิด คือ สารสกัดจากยีสต์ คาซิโตน กรดคาสซามิโน พอลีเปปโตน โปรติโอสเปปโตน หมายเลข 3 และ สารสกัดจากเนื้อวัว ในปริมาณเท่ากับ 0.10 และ 1.0 กรัมต่อลิตร โดยมีชุดควบคุมซึ่งมีปริมาณและองค์ประกอบของสารอาหารตามสูตร MSM ทุกประการ และมีแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1.0 กรัมต่อลิตร และ สารสกัดจากยีสต์ ปริมาณ 0.10 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณ PHB และน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยเริ่มต้นเก็บตัวอย่าง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24

10.การหาชนิด และปริมาณสาร dissociating agent ที่เหมาะสม

สาร dissociating agent ที่ใช้คือ SDS (Sodium dodecyl sulphate) และ Tween 80 (Polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate) แปรผันปริมาณ SDS ที่ใช้เท่ากับ 0 0.25 และ 0.50 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ แปรผันปริมาณ Tween 80 เท่ากับ 0 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 และ 4.0 เปอร์เซนต์(ปริมาตรต่อปริมาตร) ถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากการศึกษา หน้า 35 ปริมาณ 1 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาณ 50 มล. ที่ใช้ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนตามข้อ 1 ใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ตามข้อ 2 สัดส่วนฟอตเฟต และโพแทสเซียมตามข้อ 7 และ ปริมาณแมกนีเซียมตามข้อ 8 ส่วนสารอาหารชนิดอื่นๆ ตามสูตร MSM ที่แสดงในข้อ 4 หน้า 27 ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มล. ค่าพีเอชเริ่มต้น และอุณหภูมิที่เหมาะสมใช้ ตามข้อ 4 และ 5 ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณ PHB และน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยเก็บตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24

การหาปริมาณ PHB

ใช้วิธีของ อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) ซึ่งได้ปรับปรุง วิธีการสกัด PHB จากวิธีเดิมของ Brivonese และ Sutherland (1989) โดยนำเซลล์ที่แยกได้จากการปั่นน้ำหมักปริมาณ 5 มล.ที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ที่ความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิม เติมสารละลายคลอรอกซ์ ปริมาณ 1 มล. บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาขจัดคลอรอกซ์โดยเติมน้ำกลั่นปริมาณ 4 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนด้วย อะซิโตน และเอทธานอลบริสุทธิ์ ปริมาณ 5 มล. เพื่อขจัดผิวเซลล์ (cell membrane) ออก โดยการปั่นที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ตามลำดับ หลังการปั่นทำการอบแห้ง เพื่อขจัดเอทธานอล จะได้ตะกอนบริสุทธิ์ แล้วจึงนำมาเติมคลอโรฟอร์มปริมาณ 5 มล. เพื่อสกัด PHB ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำไปปั่นเก็บส่วนใสไว้ นำส่วนที่เป็นตะกอน ไปสกัด

PHB อีกครั้ง รวมส่วนใสที่ได้กรอง ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ปรับปริมาตรของสารละลายที่ได้ด้วยคลอโรฟอร์ม ให้มีปริมาตรเป็น 10 มล. ซึ่งจะทำไปวิเคราะห์หาปริมาณ PHB ต่อไป โดยทำให้อยู่ในความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วจึงนำมาปริมาณ 1 มล. อบแห้งในตู้อบ 80 °ซ เป็นเวลา 30 นาที เมื่อระเหยส่วนของคลอโรฟอร์มออกหมด จึงเติมกรดซัลฟุริกเข้มข้นปริมาณ 3 มล. ต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็น blank แทนสารละลาย PHB

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ได้มาคำนวณหาปริมาณ PHB โดยเปรียบเทียบกับ ปริมาณ PHB มาตรฐาน ซึ่งเตรียมจาก สารผลิตภัณฑ์ ผลิตจากเชื้อ BA-019 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ดังวิธีหน้า 31 ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 235 นาโนเมตร (ภาคผนวกที่ 3) ตามสูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)} = 1/\text{ความชัน} \times \text{ค่าการเจือจาง} \times A_{235} \times \frac{3 \times 10}{5 \times 1000 \times 1}$$

การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำเซลล์ที่แยกได้จากการปั่นน้ำหนัก ปริมาณ 10 มล.ที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 นาที ปั่นล้างเซลล์ ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ที่ความเร็วรอบ และเวลาเท่าเดิม อบเซลล์ที่ผ่านการปั่นล้างแล้ว ในถ้วยอลูมิเนียมที่อบแห้ง และทราบน้ำหนักถ้วย ที่อุณหภูมิ 80 °ซ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง โดยคำนวณหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งได้ดังนี้

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม\ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์} - \text{น้ำหนักถ้วยเปล่า}}{10} \times 1000$$

การหาปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสที่ไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์อื่นเจือปนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในขั้นตอนคัดแยกเชื้อ ได้หาปริมาณฟรุคโตสที่เหลือ โดยใช้วิธีของBernfeld(1955) โดยนำส่วนใสที่ได้จากอาหารที่ทำการปั่นแยกเซลล์ปริมาณ 1 มล. เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic acid : DNSA reagent) (ภาคผนวกที่ 4) ปริมาณ 1 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาณ 10 มล. ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณฟรุกโตส โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานฟรุกโตส และค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (ภาคผนวกที่ 5) จากสูตรดังนี้

ปริมาณฟรุกโตส(มก./มล.) =(1/ความชัน) x A_{540} x ค่าการเจือจาง x1/1000

การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์อื่นเจือปนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในขั้นตอนคัดแยกเชื้อ ได้หาปริมาณกลูโคสที่เหลือ โดยใช้วิธีของ Somogyi และ Nelson (1951) (ภาคผนวกที่ 6) โดยนำส่วนใสที่ได้จากอาหารที่ทำการปั่นแยกเซลล์ ปริมาณ 1 มล. เติมสารละลายคอปเปอร์รีเอเจนต์ 1 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งให้เย็น เติมสารละลายเนลสันปริมาณ 1 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 5 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณกลูโคส โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร (ภาคผนวกที่ 7)จากสูตรดังนี้

ปริมาณกลูโคส (มก./มล.) =(1/ความชัน) x A_{540} x ค่าการเจือจาง x1/1000

การหาปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์อื่นเจือปนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในขั้นตอนคัดแยกเชื้อ ได้หาปริมาณซูโครสที่เหลือ โดยการไฮโดรไลส์น้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ แล้วหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี Asenomolybdate ของ Somogyi และ Nelson (1951) (ภาคผนวกที่ 6) ด้วยการนำส่วนใสของการนำส่วนใสของอาหารที่ทำการปั่นแยกเซลล์ ปริมาณ 1 มล. ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปกรวยขนาด 1 มล. ซึ่งมีหลอดแก้วเสียบตรงกลางจุกสูง ประมาณ 1 ฟุต แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริก 0.1 เปอร์เซนต์ ปริมาณ 40 มล. ต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำให้เย็นลง ประมาณ 60 °ซ ทำให้เป็นกลาง ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล เพื่อให้ได้พีเอชเป็น 5.0 ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำส่วนใสที่ได้ ปริมาณ 2 มล. มาเติมสารละลายคอปเปอร์รีเอเจนต์ ปริมาณ 2 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งให้เย็น เติมสารละลายเนลสัน ปริมาณ 1 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 25 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณซูโครส โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานซูโครส และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร (ภาคผนวกที่ 8) จากสูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณซูโครส(มก./มล.)} = (1/\text{ความชัน}) \times A_{520} \times \text{ค่าการเจือจาง} \times 1/1000$$

การหาปริมาณโปรตีนของเซลล์(cellular protein)

ใช้วิธีของ Lowry และคณะ (1951) นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นน้ำหมักปริมาณ 5 มล มาเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1N จำนวน 5 มล. นำไปอุ่นในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำสารละลายโปรตีนที่ทำการเจือจางปริมาณ 1 มล. เติมสารละลาย Lowry C (ภาคผนวกที่ 9) ปริมาณ 5 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วเติมสารละลาย Lowry D (ภาคผนวกที่ 9) ปริมาณ 0.5 มล. ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน Bovine Serum Albumin(BSA) และค่า

การดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร (ภาคผนวกที่ 10) จากสูตรดังนี้

ปริมาณโปรตีน(มก./มล.) =(1/ความชัน) x A_{520} x ค่าการเจือจาง x 1/1000

<u>การหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก</u>

ตามวิธีของ Kempers (1974) เติมโปแตสเซียมคลอไรด์ (ภาคผนวกที่ 11) ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาณ 5 มล. และสารละลาย EDTA (ภาคผนวกที่ 11) ปริมาณ 1 มล. ลงในส่วนใสปริมาณ 5 มล.ที่ได้จากการแยกปั่นน้ำหมักปริมาณ 5 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้นาน 1 นาที แล้วเติมฟีนอลไนโตรพัสซายด์รีเอเจนท์ (ภาคผนวกที่ 11) ปริมาณ 2 มล. บัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรท์รีเอเจนท์ (ภาคผนวกที่ 11) ปริมาณ 4 มล. และ น้ำกลั่นปลอดประจุปริมาณ 8 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นใน อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจน (NH_4^+-N) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร (ภาคผนวกที่ 12) คำนวนหาค่าปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ดังนี้

ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (มก./มล.) = OD_{636} x ความชัน x ค่าการเจือจาง x $\frac{132}{28 \times 10^3}$

หมายเหตุ 132 คือ น้ำหนักโมเลกุลของแอมโมเนียมซัลเฟต

28 คือ น้ำหนักโมเลกุลของธาตุไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟต

<u>การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลในกากน้ำตาล ด้วยเครื่องลิควิดโครมาโตกราฟี</u>

เตรียมกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 20 และ 30 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำมาปั่นที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อขจัดอนุภาคที่ปนเปื้อนในกากน้ำตาลออก แล้วจึงเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม กรองผ่าน

กระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน นำส่วนที่กรองได้ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์หาน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตสและซูโครส โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีก (peak area) ของน้ำตาลแต่ละชนิด กับ น้ำตาลมาตรฐานแต่ละชนิด (ภาคผนวกที่ 13 ก. 13 ข.และ 13 ค.) โดยแสดงโครมาโตแกรมของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดจากกากน้ำตาล เปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครสมาตรฐานไว้ ในภาคผนวกที่ 14

คอลัมน์	: Phenomenax Spherisorb NH_2
Detector	: Refractive Index Detector
Flow rate	: 2 มล./นาที
mobile phase	: 75 % อะซีโตไนไตรล์
ปริมาณสารตัวอย่าง	: 20 ไมโครลิตร